



Республика Таджикистан

(19) **TJ** (11) **322**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО

(51) **7 A01H 1/04, A01G 7/00**

(12) **Описание изобретения** К ПАТЕНТУ

1

2

(21) 99000573

(22) 26.05.99

(46) 24.12.2001, Бюл.№4 (24)

(71) Научно-исследовательский институт биотехнологии ТАУ (TJ)

(72)(73) Муминджанов Х.А., Анварова М.А., Насыров Ю.С. (TJ)

(56) 1. Филиппов А.С., Иванченко Г.З. Селекция картофеля. - М.: Колос, 1964. - 231с.

2. Сидоров В.В. Биотехнология растений. Клеточная селекция. - Киев: Наукова думка, 1990. - 290 с.

3. Plant Cell Physiology. - 1995. - 36(7). - PP. 1245-1251.

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ТЕПЛОУСТОЙЧИВЫХ ФОРМ КАРТОФЕЛЯ

(57) Изобретение относится к области физиологии, биотехнологии и селекции картофеля и может быть использована для выведения новых высокопродуктивных сортов, устойчивых к повышенным температурам с целью их выращивания в южных районах.

Целью изобретения является эффективное ведение отбора клеточных линий картофеля, устойчивых к повышенным температурам и закрепление искомого признака в геноме нового сорта.

Поставленная цель достигается путем отбора высокопродуктивных сортов *in vivo*, выбора образцов, обладающих высоким каллусообразующим свойством и повышенным морфогенным потенциалом *in vitro*, проведением теста на теплоустойчивость *in vitro* по принципу многоступенчатого скрининга, т.е. проведения отбора в несколько этапов (на уровне мериклонов, каллусных тканей и калликлонов) при воздействии экстремальных условий и этим закрепляется искомый признак в генотипе сорта.

Предлагаемый способ многоступенчатого скрининга теплоустойчивых линий картофеля опираясь на естественную гетерозиготность соматических клеток позволяет значительно улучшить хозяйственноценные признаки существующих сортов.

Изобретение относится к области физиологии, биотехнологии и селекции картофеля и может быть использована для выведения новых высокопродуктивных сортов, устойчивых к повышенным температурам с целью их выращивания в южных районах.

Картофель богат генами устойчивости к стрессовым воздействиям и характеризуется адаптивностью к изменяющимся факторам среды. Однако селекционерами незначительная часть генетического ресурса картофеля используется для выведения новых сортов. Также далеко не исчерпан его генетический потенциал продуктивности.

Традиционная селекция картофеля, обычно сочетающая клоновый отбор с внутри- и межвидовыми скрещиваниями, становится ограниченным и малоэффективным, потому что многие сорта не цветут, треть не образует ягод, у большинства семена стерильные и размножение их вызывает проблемы. С другой стороны, сорта картофеля характеризуются высокой гетерозиготностью генома (1).

В связи с этим, в последнее время для ускорения селекционного процесса и повышения его эффективности в селекционную схему картофеля все чаще включаются нетрадиционные методы и технологии, как клеточная селекция, индуцированный мутагенез, гибридизация соматических клеток и другие биотехнологические приемы.

При проведении клеточной селекции растений в основном используется культура каллусов или культура суспензии клеток. Селекцию на клеточном уровне можно вести с целью получения устойчивых к экстремальным условиям, гербицидам, растворам солей, токсинам, антивирусной РНК и другим стрессовым факторам генотипов. Для достижения целей суспензия клеток или каллусы подвергаются воздействию одного из вышеуказанных стрессовых факторов и ведется отбор устойчивых клеточных линий, из которых будут регенерированы растения, обладающие искомым признаком (2, 3).

Недостаток этого метода селекции заключается в том, что часто при работе с линиями клеток растений, отобранных по принципу устойчивости, наблюдается нестабильность искомого признака, которая проявляется после снятия давления отбора. Часто не совпадают результаты скрининга клеток и тканей, с одной стороны, и целых растений - с другой, часто объясняется стрессовой ре-

акцией. Устойчивый клеточный фенотип может быть эпигенетическим по своей природе и не иметь практической ценности для селекции устойчивых форм растений.

Целью изобретения является эффективное ведение отбора клеточных линий картофеля, устойчивых к повышенным температурам и закрепление искомого признака в геноме нового сорта.

Поставленная цель достигается путем отбора высокопродуктивных сортов *in vivo*, выбора образцов, обладающих высоким каллусообразующим

свойством и повышенным морфогенным потенциалом *in vitro*, проведением теста на теплоустойчивость *in vitro* по принципу многоступенчатого скрининга, т.е. проведения отбора в несколько этапов (на уровне мериклонов, каллусных тканей и калликлонов) при воздействии экстремальных условий и этим закрепляется искомый признак в генотипе сорта, что показано на рисунке.

Сущность метода заключается в следующем:

В полевых условиях проводят отбор высокопродуктивных образцов растений картофеля по морфо-физиологическим и хозяйственно-ценным признакам. После созревания клубней и прохождения ими термотерапии и выгонки этиолированных проростков, вычленивают апикальную меристему и культивируют ее на модифицированной питательной среде Мурасиге-Скуга *in vitro*. Из меристематических тканей после трехкратного их пассирования в новые культуральные среды, в зависимости от биологии сорта, через 120-195 дней регенерируют растения - мериклоны. Для изучения каллусообразующей способности соматических клеток и морфогенетического потенциала каллусных тканей из мериклонов вычленивают экспланты и культивируют на среде, содержащей повышенные концентрации фитогормонов 2,4-Д (3,0 мг/л) и кинетина (0,5 мг/л). Этим методом выявляют сорта, обладающие более высоким каллусообразующим свойством и повышенным морфогенетическим потенциалом.

В целях предварительного скрининга селекционных образцов картофеля по степени толерантности к высокой температуре, 200-300 мериклонов каждого сорта подвергают воздействию температуры +35°C в течение 1-го часа. Через 10-12 дней после воздействия теплошока проводят учет устойчивости, изучая при этом степень поражения растений и угнетения роста органов. Выжившие растения (мериклоны) размножают до достижения 200-300 штук микрочеренкованием *in vitro*. Полноценные растения по достижении высоты 6-8 см вновь подвергаются теплошоку при температуре +40°C в течение 1-го часа. Через 10-12 дней, после проведения учета устойчивости растений по внешним морфологическим и ростовым показателям, выжившие образцы вновь микрочеренкуют до достижения 200-300 штук и культивируют до формирования регенерантов высотой 6-8 см и снова подвергают воздействию температуры +45°C в течение 1 часа. Снова через 10-12

дней после теплошока отбирают выжившие растения и их микрочеренкуют для получения исходного количества образцов. По мере формирования полноценных регенерантов они вновь подвергают тепловому воздействию их выдерживанием при температуре +50°C в течение 1 часа.

После отбора наиболее устойчивых генотипов проводят направленную селекцию на клеточном уровне образцов, толерантных к шоковым воздействиям и регенерации растений из устойчивых каллусных линий. Для этого из мериклонов, выживших при температуре +50°C вычленивают

экспланты и культивируют на среде для индукции каллусообразования. Путем воздействия на каллусные структуры стрессовым фактором и дальнейшего пассирования их на морфогенной среде отбирают клеточные линии, устойчивые к теплошоку. Для этого полученные каллусы по мере достижения ими размера 5-6 мм в диаметре в стерильных условиях расчлениают на фрагменты размером 2 x 2 мм и до достижения 200 образцов культивируют на модифицированной среде Мурасиге-Скуга. Затем эти каллусные ткани подвергают тепловому воздействию выдерживанием их при температуре +30 - +35°C в течение 30 минут. Из выживших клеток каллуса после пролиферации регенерируют растения - калликлоны, которые микрочеренкуют до достижения определенного

количества и снова проходят тест *in vitro*, как мериклоны, по принципу многоступенчатого отбора для выявления степени стабильности их теплоустойчивости.

Заключительный этап оценки селекционного материала и скрининга проводится в естественных условиях, где будут выращиваться отобранные генотипы, проявившие наибольшую устойчивость к воздействиям повышенных температур *in vitro*.

Предлагаемый способ многоступенчатого скрининга теплоустойчивых линий картофеля опираясь на естественную гетерозиготность соматических клеток позволяет значительно улучшить хозяйственно-ценные признаки существующих сортов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ получения теплоустойчивых форм картофеля на клеточном уровне, включающий получение каллусов *in vitro*, подвержение их воздействию высокой температуры и из выживших клеточных популяций получение регенератов, *отличающийся* тем, что мериклоны в течение 1 часа подвергают поэтапно усиливающему теплошоку (35, 40, 45 и 50°C), затем каллусы, получен-

ные из эксплантов толерантных к теплошоку мериклонов подвергают в течение 30 минут, температуре 30 и 35°C, после калликлоны, регенерированные из устойчивых к высокой температуре каллусных тканей в течение 1 часа подвергают тепловому воздействию (35, 40, 45 и 50°C) и среди них проводят отбор теплоустойчивых образцов.